

综合生物信息学方法识别精神分裂症状中 关键线粒体自噬基因

廉坤¹⁾, 李咏梅²⁾, 施诚龙¹⁾, 陈怡兰³⁾, 张磊³⁾, 杨薇³⁾, 许秀峰⁴⁾

(1)昆明医科大学第二附属医院神经外科; 2)康复医学部, 云南昆明 650101; 3)玉溪市第二人民医院/昆明理工大学附属玉溪医院精神科, 云南玉溪 653100; 4)昆明医科大学第一附属医院精神科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 利用3D脑类器官的单细胞及外周血转录组数据, 结合机器学习, 深入分析线粒体自噬基因在精神分裂症(schizophrenia, SCZ)中的作用。**方法** 结合两种机器学习算法, 通过外周血RNA测序数据, 识别精神分裂症和健康对照组之间表达存在差异的线粒体自噬相关基因, 探讨线粒体自噬基因与免疫细胞和炎症因子间的相互关系; 利用单细胞综合分析, 探讨基于线粒体自噬基因的信号通路和特异性转录因子。**结果** 通过机器学习, 鉴定了7个在精神分裂症患者中表达的关键线粒体自噬基因。基于Mitoscore分析, 在单细胞层面, 现高线粒体自噬活性的神经元(Mitohigh_Neuron)通过SPP1信号通路与内皮细胞形成新的相互作用。**结论** 鉴定了精神分裂症患者中两种具有线粒体自噬特征的亚型及7个关键线粒体自噬基因, 为理解该病的发病机制提供新的视角。

[关键词] 精神分裂症; 线粒体自噬; 神经元; 单细胞测序; 机器学习

[中图分类号] R749.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2025)01-0023-13

Identify Key Mitochondrial Autophagy Genes in Schizophrenia through Integrated Bioinformatics Approaches

LIAN Kun¹⁾, LI Yongmei²⁾, SHI Chenglong¹⁾, CHEN Yilan³⁾, ZHANG Lei³⁾, YANG Wei³⁾, XU Xiufeng⁴⁾

(1) Department of Neurosurgery; 2) Department of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Department of Psychiatry, The Second People's Hospital of Yuxi/Yuxi Hospital Affiliated to Kunming University of Science and Technology, Yuxi Yunnan 653100; 4) Department of Psychiatry, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To utilize single-cell and peripheral blood transcriptomic data from 3D brain organoids, combined with machine learning, to analyze the role of mitochondrial autophagy genes in schizophrenia (SCZ). **Methods** By integrating two machine learning algorithms, we identified differentially expressed mitochondrial autophagy-related genes between schizophrenia patients and healthy controls using peripheral blood RNA sequencing data. The relationship between mitophagy gene, immune cells and inflammatory factors was further explored. Comprehensive single-cell analysis was used to explore the signaling pathways and specific transcription factors based on mitophagy genes. **Results** Using machine learning, seven key mitophagy genes expressed in schizophrenia patients were identified. Based on Mitoscore analysis, at the single-cell level, neurons with high mitochondrial autophagy activity (Mitohigh_Neuron) formed new interactions with endothelial cells via the SPP1

[收稿日期] 2024-09-30

[基金项目] 云南省精神心理疾病临床医学研究中心(202102AA100058); 昆明理工大学医学联合专项(KUST-YX2022002)

[作者简介] 廉坤(1983~), 男, 河南南阳人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事神经精神疾病的研究工作。

[通信作者] 杨薇, E-mail: laoyangwei_75121@sina.com; 许秀峰, E-mail: xfxu2004@sina.com

signaling pathway. **Conclusion** This study identified two subtypes of mitophagy and seven key mitophagy genes in schizophrenia, providing new insights into the pathogenesis of the disease.

[**Key words**] Schizophrenia; Mitochondrial autophagy; Neurons; Single-cell sequencing; Machine learning

精神分裂症是一类由多种因素引起的精神障碍, 涉及遗传、神经发育、免疫系统及环境等方面, 其具体的发病机制尚未完全明确^[1]。目前, 已知大多数与精神分裂症相关的遗传因素为常见但效应较小的等位基因, 同时也有一些罕见的拷贝数变异和编码区变异^[2-4]。近期的研究^[5-6]成果指出, 精神分裂症可能与线粒体功能障碍紧密相关, 特别是线粒体自噬过程的异常。线粒体作为细胞的能量工厂, 在调控细胞凋亡和应对氧化应激等生理活动中发挥关键作用^[7-8]。线粒体功能障碍已被证实与多种神经系统疾病的发生发展有关, 尤其是精神障碍^[9-11]。实际上, 在精神分裂症患者的脑部已观察到线粒体 DNA 的损伤和线粒体膜电位的降低, 这些病理变化影响了线粒体自噬的正常进行, 进而可能导致细胞凋亡的增加^[12-13]。

本研究利用多种机器学习技术和单细胞综合分析, 探究异常线粒体自噬基因在精神分裂症发病机制中的作用及与免疫细胞和炎症因子的关系。本研究鉴定的线粒体自噬相关基因有望成为精神分裂症诊断和治疗的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 数据获取

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中获取两个 SCZ 的数据集, 分别为 GSE38484(基于 GPL6947 Illumina HumanHT-12 V3.0 微阵列平台)和 GSE38481(基于 GPL6883 Illumina HumanRef-8 V3.0 微阵列平台)。此外, 线粒体自噬相关基因的数据集通过访问在线资源(<https://www.gsea-msigdb.org/>)获得。单细胞数据来自于 GSE184878 数据集, 该数据集包含 4 个正常样本和 3 个 SCZ 的 3D 脑类器官样本的单细胞 RNA 测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)数据。

1.2 差异表达分析

对 GSE38484 和 GSE38481 数据集进行 R 语言中的"limma"包处理, 包括数据校正、标准化和

合并, 形成一个新的数据集, 涵盖 121 名精神分裂症患者和 118 名健康对照者的基因表达数据。设定 $P < 0.05$ 且 $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1.5$ 的标准, 进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选。利用 R 语言中的"heatmap"包和"ggplot2"包分别生成热图和火山图。

1.3 基因集富集分析

通过 R 语言的"msigdb"包从分子特征数据库(molecular signatures database, MSigDB)中获取与人相关的"Hallmark"基因集。采用单样本基因集富集分析(single sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA)方法, 对两组间的 DEGs 进行分析。同时, 运用基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)方法, 基于京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库, 对精神分裂症患者与对照者在线粒体自噬途径上的差异进行比较分析。

1.4 通过机器学习鉴定关键线粒体自噬基因

采用两种先进的机器学习技术: 支持向量机(support vector machine, SVM)和随机森林(random forest, RF)来识别具有潜力的线粒体自噬基因。通过这两种方法鉴定出的基因进行交集, 筛选出与精神分裂症最相关的关键线粒体自噬基因, 并通过多因素逻辑回归建立诊断模型。

1.5 关键线粒体自噬基因与免疫浸润之间的关系

使用 CBERSORT 算法分析线粒体自噬基因在精神分裂症中的免疫浸润^[14]。通过 IOBR 软件包中的"corrplot"和"vioplot"函数评估免疫细胞类型与 7 个关键线粒体自噬基因之间的相关性^[15]。此外, 进一步分析炎症因子与线粒体自噬基因之间的关联。

1.6 计算 Mitoscore

为了更好地评估不同细胞亚群中线粒体自噬基因的相关性, 计算单细胞水平上不同线粒体自噬评分(mitophagy score, Mitoscore)^[16], 首先从 scRNA-seq 数据中计算每个基因的平均标准化 TPM 值, 并使用随机抽样方法将基因分为 50 个表达区间, 重复 1000 次; 然后, 从每个区间中随机选择特征基因; 最后, 确定属于正态分布或混合正态分布的 Mitoscore。

1.7 线粒体自噬亚型的分类

使用 R 包 ConsensusClusterPlus 对 24 个线粒体自噬基因进行聚类, 并使用 calscore 进行评分。通过这种方法, 成功区分出两个稳定的基因亚型, 通过热图直观地展示不同基因在各个亚型中的表达差异。进一步分析 SCZ 患者临床特征中年龄、性别、预测值、线粒体自噬基因表达水平、免疫细胞和炎症因子的差异。

1.8 多重聚类分析

使用 R 包加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)中的 goodSamplesGenes 方法移除异常基因和样本并构建无标度共表达网络, 并将灵敏度设置为 3。纳入距离小于 0.5 的模块, 形成 12 个共表达模块。无法分配到任何模块的基因集形成了灰色模块, 为无效模块。利用在线工具 Metascape(<https://metascape.org>)进行基因集富集分析(fast gene set enrichment analysis, fGSEA)。

1.9 单细胞分析

从 GSE184878 数据集下载来自精神分裂症患者和健康对照的 3D 脑类器官的 scRNA-seq 数据。排除少于 200 个基因或多于 2500 个基因的细胞, 使用自动化细胞类型注释工具 SingleR v1.4.116 识别主要的细胞类型, 并使用 MonacoImmuneData 函数选择细胞类型标记。使用 Seurat 中的 FindAllMarkers 函数对每个选定的簇进行每个选定的主要细胞类型的相关基因表达分析。从分子特征数据库 v7.5 HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE 中获取炎症基因。使用 R 包 Monocle 3 进行逆时序分析, 获得精神分裂症和对照样本中单个细胞的线粒体自噬基因得分。根据高、中、低线粒体自噬基因得分, 将神经元分类为 Mitohigh_Neuron、Mitomedian_Neuron 和 Mitolow_Neuron 3 个亚组。

1.10 细胞间通讯分析

使用 CellphoneDB 软件包分析不同细胞类型之间的配体/受体表达情况来分析细胞-细胞相互作用。将 scRNA-seq 计数矩阵中的统计迭代次数设置为 1000, 并排除每个簇中少于 10% 的细胞表达的基因。使用 CellPhoneDB 存储库来识别细胞-细胞相互作用, $P < 0.05$ 为显著性阈值。使用网络图来说明 Mitohigh_Neuron、Mitomedian_Neuron 和 Mitolow_Neuron 组配体-受体相互作用的差异。

1.11 Mitoscore 组的 SCENIC 分析

使用基于 Python 的 pySCENIC 包分析转录因

子(transcription factors, TF)的基因调控网络。首先, 使用 GENIE3 算法从 scRNA-seq 数据的计数矩阵中识别共表达基因和 TF 的模块; 然后, 使用 RcisTarget 通过顺式调节基序识别可能的靶基因来识别这些模块; 最后, 使用恢复分析量化并绘制每个 TF 和每个细胞中潜在靶基因的活性。使用热图可视化 Mitohigh_Neuro 和 Mitolow_Neuro 组之间 TF 活性得分的差异。

1.12 统计学分析

所有分析均使用 R 版本 4.2.1 进行。使用 Wilcoxon 秩和检验比较测量数据。使用 Spearman 相关分析确定变量之间的相关系数。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)曲线并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)值以评估变量的诊断性能。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 线粒体自噬基因的差异表达分析

通过差异表达基因分析, 获得精神分裂症和对照组之间 6 个显著的差异表达线粒体自噬基因: CSNK2B、TOMM40、TOMM20、MAP1LC3A、MAP1LC3B 和 MFN1, 见图 1A ~ 图 1B。24 个线粒体自噬基因在 SCZ 和对照组之间的箱线图见图 1C。此外, 24 个线粒体自噬基因之间的相关系数见图 2A ~ 图 2B。CSNK2B 差异表达尤其显著, 并与 TOMM40 呈正相关($P = 6.75e-04$), 与 TOMM20 ($P = 6.22e-03$)、MAP1LC3B ($P = 6.31e-04$) 和 MFN1 ($P = 3.23e-06$) 呈负相关, 见图 2C ~ 图 2G。

2.2 机器学习确定关键线粒体自噬基因

通过 SVM 和 RF 两种方法鉴定出的关键线粒体自噬基因, 建立诊断模型, 其 ROC 曲线的 AUC = 0.729, 见图 3A。7 个关键线粒体自噬基因的 OR 值和 95%CI 如下: CSNK2B ($OR = 10.66$, $95\%CI = 2.73 \sim 45.8$)、TOMM40 ($OR = 2.77$, $95\%CI = 0.54 \sim 14.54$)、MAP1LC3B ($OR = 1.12$, $95\%CI = 0.24 \sim 5.41$)、MFN1 ($OR = 0.4$, $95\%CI = 0.04 \sim 4.07$)、CSNK2A2 ($OR = 3.27$, $95\%CI = 0.52 \sim 21.45$)、PGAM5 ($OR = 0.00$, $95\%CI = 0.00 \sim 0.07$) 和 ATG12 ($OR = 1.76$, $95\%CI = 0.61 \sim 5.34$), 见图 3B。

2.3 与线粒体自噬相关的免疫浸润分析

线粒体自噬基因与 22 种免疫细胞相对分布之间的关系, 见图 4A。线粒体自噬基因与中性粒细胞、活化树突状细胞、活化 NK 细胞、静息 NK 细胞、调节性 T 细胞、活化 CD4 记忆 T 细胞和

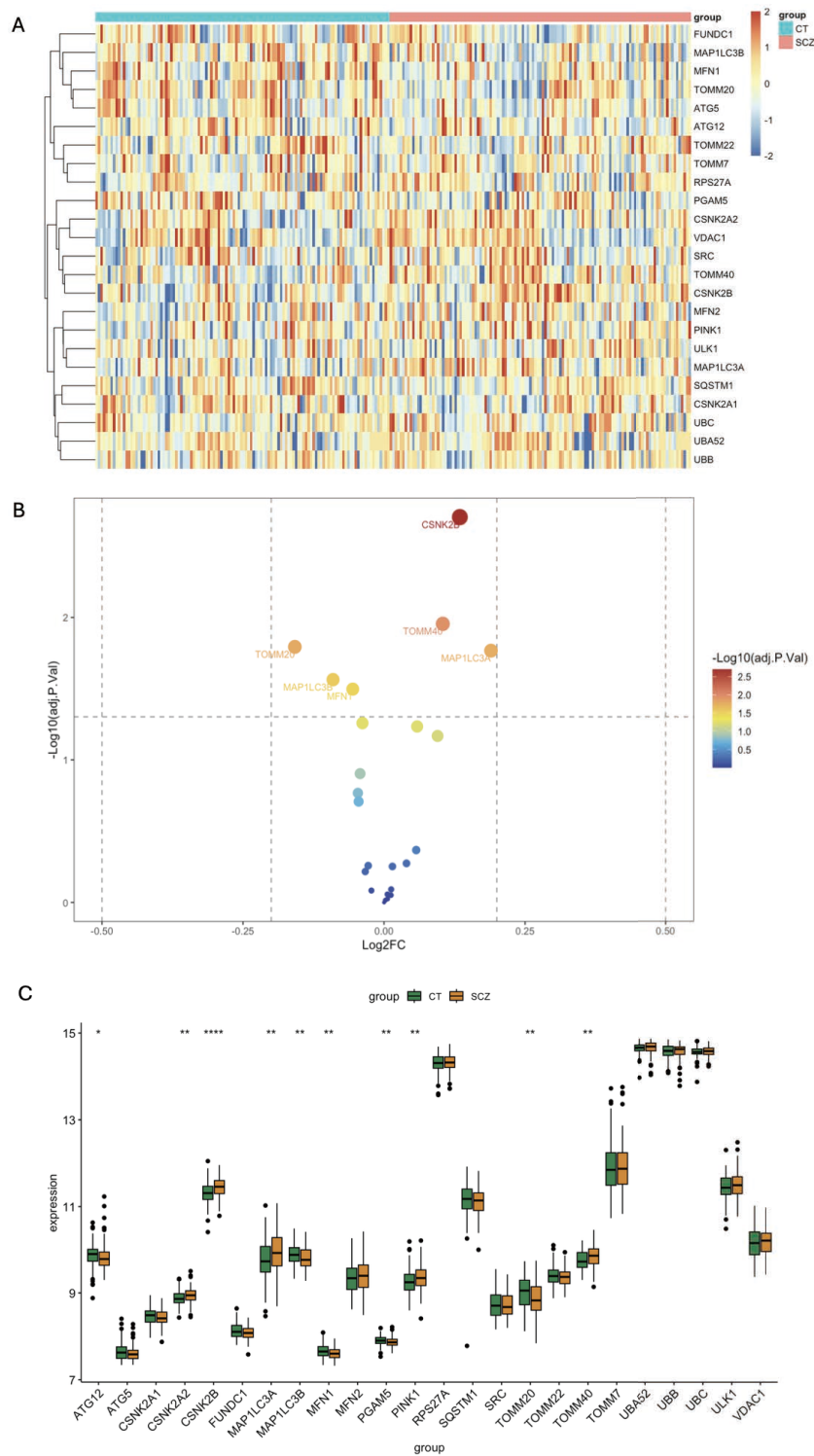


图 1 在 SCZ 中表达的 24 个线粒体自噬基因分析

Fig. 1 Analysis of 24 mitochondrial autophagy genes expressed in SCZ

A: SCZ 组与 CT 组 24 个线粒体自噬基因热图; B: SCZ 组与 CT 组差异表达基因集与线粒体自噬基因交集火山图; C: SCZ 组与 CT 组 24 个线粒体自噬基因的条形图。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

CD8 T 细胞显著相关。MFN1($r = 0.21$, $P = 1.02e-03$)和MAP1LC3B($r = 0.48$, $P = 3.77e-15$)与中性粒细胞呈正相关, 而 TOMM40($r = -0.58$, $P = 7.67e-23$)、CSNK2A2($r = -0.43$, $P = 2.33e-12$)、

PGAM5($r = -0.15$, $P = 0.02$)和CSNK2B($r = -0.33$, $P = 2.05e-07$)与中性粒细胞呈负相关, 然而 ATG12($r = -0.07$, $P = 0.31$)与中性粒细胞相关性不显著, 见图 4B ~ 图 4I。基于上述结果, 进一步

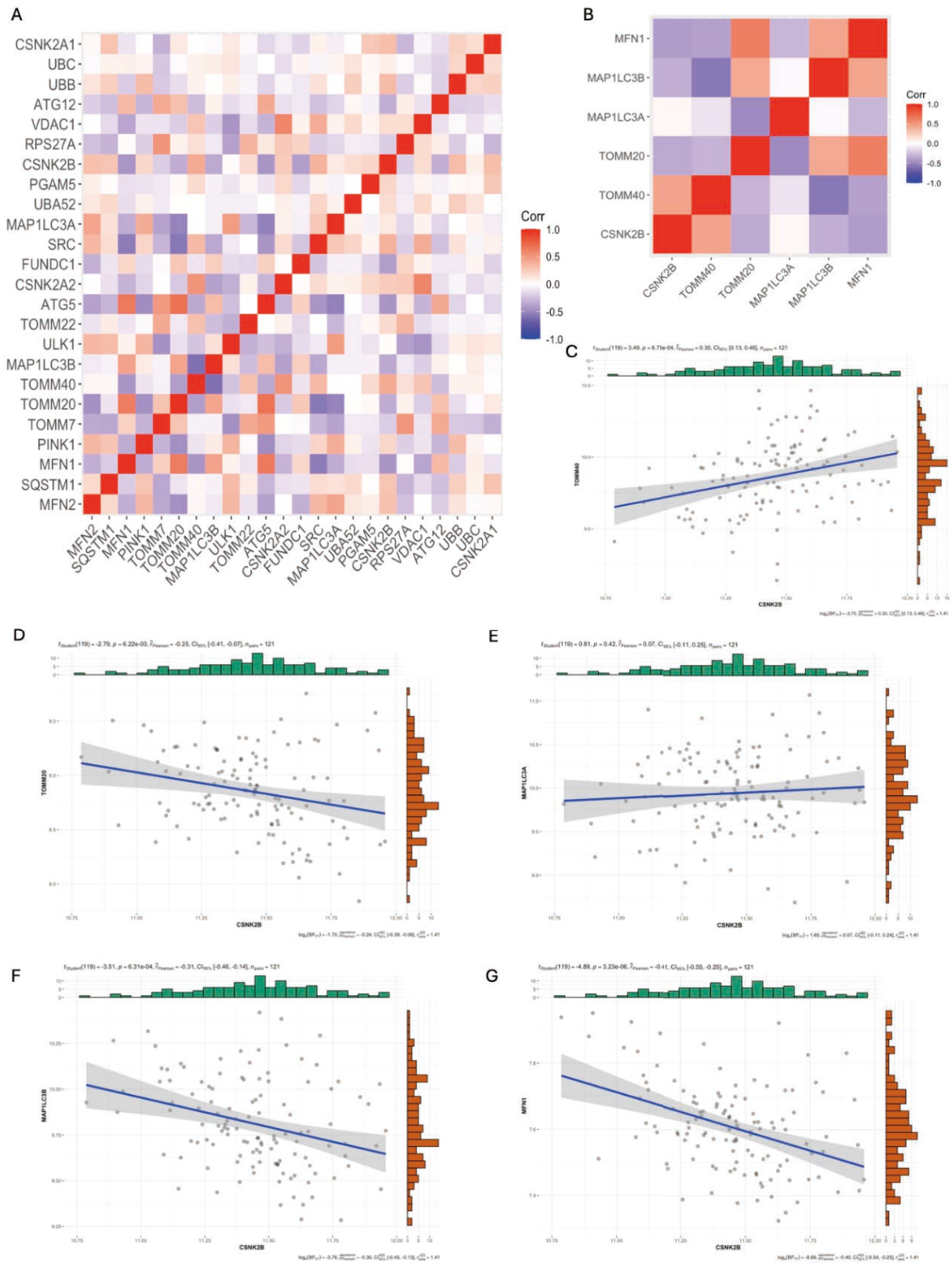


图 2 线粒体自噬基因相互作用关系图

Fig. 2 Diagram of mitophagy gene interactions

A: 24 个显著差异线粒体自噬基因的热图; B: 6 个显著差异表达线粒体自噬基因的热图; C: CSNK2B 与 TOOM40 的相关性; D: CSNK2B 与 TOOM20 的相关性; E: CSNK2B 与 MAP1LC3A 的相关性; F: CSNK2B 与 MAP1LC3B 的相关性; G: CSNK2B 与 MFN1 的相关性。

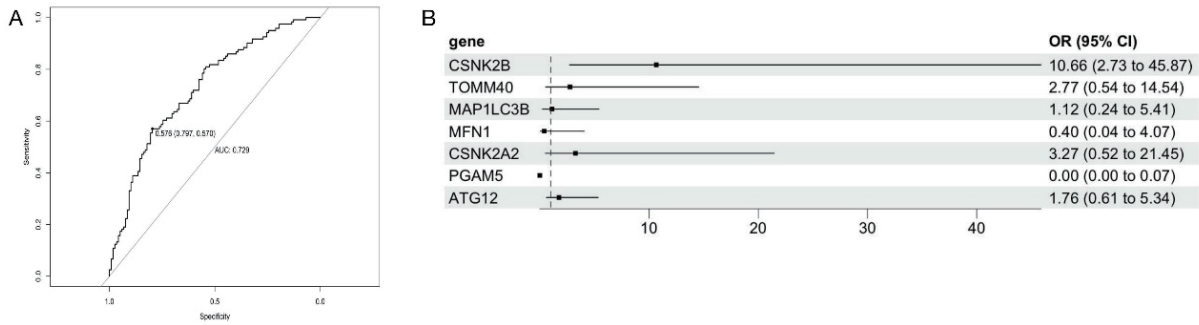


图 3 基于机器学习获得的 7 个关键线粒体自噬基因建立的诊断模型和 OR 值

Fig. 3 Diagnostic model established based on seven key mitochondrial autophagy genes obtained through machine learning and their OR values

A: 由 7 个关键线粒体自噬基因建立的诊断模型的 ROC 曲线; B: 由 7 个关键线粒体自噬基因建立的诊断模型 OR 值的森林图。

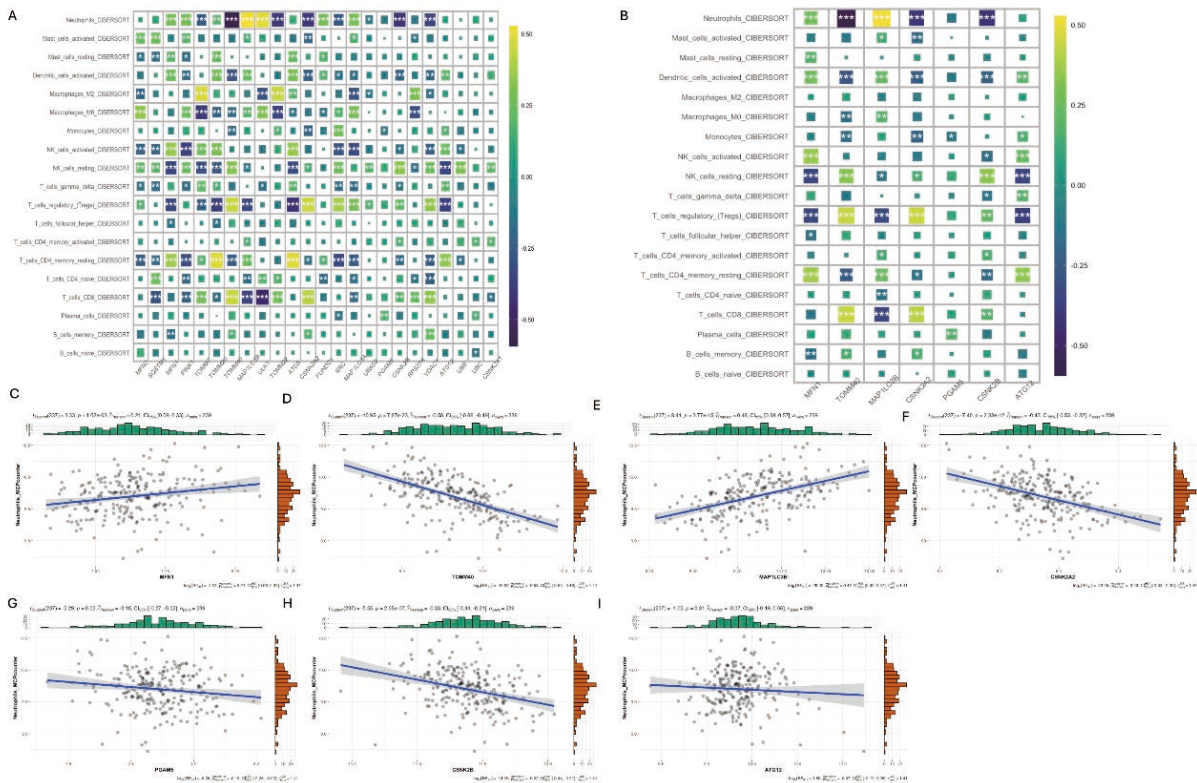


图 4 分析线粒体自噬基因与免疫细胞浸润的关系

Fig. 4 Analysis of the relationship between mitophagy genes and immune cell infiltration

A: 24 个线粒体自噬基因与 19 个免疫细胞的 CIBERSORT 相关性分析热图; B: 7 个关键线粒体自噬基因与 19 个免疫细胞的 CIBERSORT 相关性热图; C~I: 7 个关键线粒体自噬基因: MFN1, TOMM40, MAP1LC3B, CSNK2A2, PGAM5, CSNK2B, ATG12 和 Neutrophils_MCPcounter 丰度的相关性分析。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

探讨 28 种炎症因子与 7 个关键线粒体自噬基因之间的关系。FN1 与 IL-10、CD4 和 IFNB1 呈负相关($P < 0.001$), TOMM40 与 PDGFA、IL10 和 CD4 呈正相关($P < 0.001$), CSNK2A2 与 IL10、CD4 和 FGFB3 呈负相关, 与 MAP1LC3B 呈正相关($P < 0.001$), CSNK2A 与 IL-15($P < 0.001$)呈负相关和与 CD4($P < 0.001$)呈正相关, PGAM5 与 PDGFA

呈正相关($P < 0.01$), CSNK2B 与 PDGFA、HLA-DRB4、CD4 和 HLA-DRB3 呈正相关($P < 0.001$), 与 IFNG 呈负相关($P < 0.001$), ATG12 与 IFNG 呈正相关($P < 0.001$), 与 IL-10、CD4 和 HLA-DRB3 呈负相关($P < 0.001$), 见图 5。

2.4 线粒体自噬基因型的亚群结果

通过聚类分析, 将精神分裂症患者分为两个

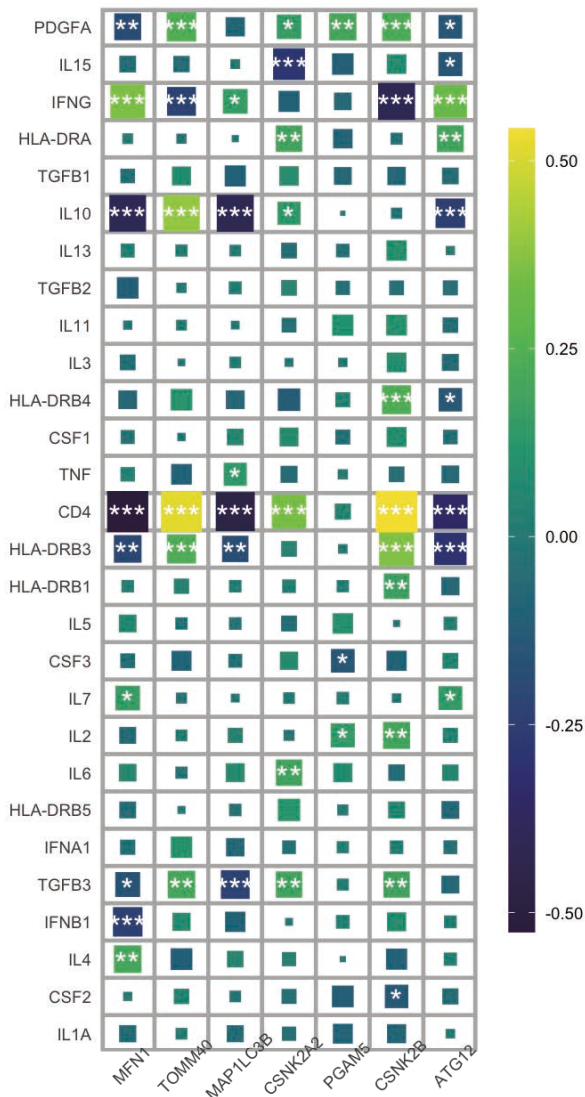


图 5 7 个关键线粒体自噬基因与 28 个炎症因子的相关性热图分析

Fig. 5 Heat map analysis of correlation between 7 top mitophagy genes and 28 inflammatory factors

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

不同的线粒体自噬亚型: C1 和 C2, 见图 6A。C1 和 C2 亚群在线粒体自噬基因的表达方面有显著差异($P < 0.01$), 见图 6B。但在年龄或性别等临床特征上差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 6B ~ 6C。C1 亚型的预测准确性高于 C2 亚型, 表明被归类为 C1 亚型的个体更有可能发展为精神分裂症($P = 0.0014$), 见图 6D。TOMM40 和 CSNK2B 在 C1 中显著激活, 而 TOMM20、MFN1 和 ATG5 在 C2 中激活, 见图 6E。此外, 虽然 T 细胞和 B 细胞在 C2 中更丰富, 但 NK 细胞在 C1 中丰度更高, 见图 6F。促炎因子 IL-7 在 C2 中增加($P < 0.05$), 而 HLA-DRB3 ($P < 0.05$)、CD4 ($P < 0.0001$)、IL-10 ($P <$

0.001)、IL-15 ($P < 0.05$) 和 PDGFA ($P < 0.01$) 在 C1 中增加, 见图 6G。

2.5 多重聚类分析

对合并的数据集通过 WGCNA 筛选与精神分裂症相关的共表达基因。WGCNA 的比例独立性和平均连通性, 见图 7A。基于最优软阈值构建共表达网络, 并绘制基因聚类树, 见图 7B。使用热图对每个样本和已识别的模块进行了关联分析。MEred 模块与 C1 ($r = -0.66$, $P = 5e-16$) 和 C2 ($r = 0.66$, $P = 5e-16$) 显著相关, 见图 7C。红色模块中基因的 GO 分析揭示了适应性免疫系统、免疫系统中的细胞因子信号转导、白细胞激活的调节以及其他与免疫反应相关的途径的显著富集 ($P < 0.01$), 见图 7D。通过 tGSEA 比较 C1 和 C2 之间的途径, 发现 C1 主要富集在粘膜固有免疫反应、细胞激活参与免疫反应以及其他免疫反应途径, 而 C2 富集在如线粒体呼吸链复合体组装和神经肽信号途径等代谢信号途径, 见图 7E。

2.6 全面的单细胞分析

通过 scRNA-seq 分析, 鉴定了 19 个细胞亚群, 见图 8A; 发现关键线粒体自噬基因在第 6、8 和 13 亚簇中最突出, 见图 8B。单细胞 PCA 识别了 6 个主要的细胞群体, 即星形胶质细胞、神经元、增殖细胞、内皮细胞、少突胶质细胞和髓系细胞, 见图 8C。神经元是主要的群体, 因此被选为后续分析。使用 Mitoscore 对神经元进行分类, 见图 8D。与对照组比较, 精神分裂症组的 Mito_Neuron 得分更高 ($P < 0.0001$), 见图 8E。进一步通过单细胞降维识别了 12 个神经元亚簇, 见图 8F; 其中第 9 簇的线粒体自噬得分最高, 而第 11 簇得分最低, 见图 8G 和图 9A。逆时序分析进一步显示, 较高的 Mitoscores 主要出现在第 9 簇的发育轨迹末端, 见图 8H。比较第 9 簇 (Mitohigh_Neuron) 和第 10 簇 (Mitolow_Neuron) 之间各种转录因子的表达水平, 包括 CEBPB、FOS、CREB5、ATF3、HDAC2、MAFF 和 TAF7。CEBPB 和 TAF7 在 Mitohigh_Neuron 中高度表达, 而 FOS 和 CREB5 在 Mitolow_Neuron 中表达水平较高, 见图 9B。

细胞间的通讯主要发生在 Mitohigh_Neuron 和内皮细胞及星形胶质细胞之间, 相互作用比较强, 见图 10A、10B。细胞间配体-受体相互作用通路的气泡图见图 10C, 主要是 ADM-CALCRL、MDK-NCL、NAMPT-(ITGA5+ITGB1) 和 SPP1-(ITGA5+ITGB1) 4 个通路。Mitohigh_Neuron-内皮细胞和

Mitolow_Neuron-内皮细胞在 ADMM-CALCRLHE、NAMPT-(ITGA5+ITGB1) 和 SPP1-(ITGA5+ITGB1) 信号通路上的相互作用有显著差异 ($P < 0.01$)。此外, Mitohigh_Neuron 和内皮细胞显示增强的 SPP1 和 NAMPT 信号, 这主要是由 CALCR、VISFATIN

和 SPP1 信号通路贡献的, 见图 10D。与此一致, Mitohigh_Neuron 与所有 3 个信号通路相关联, 见图 10E。

使用 SCENIC 分析 Mitohigh_Neuron 和 Mitolow_Neuron 亚群之间显著不同的转录因子的调控网络,

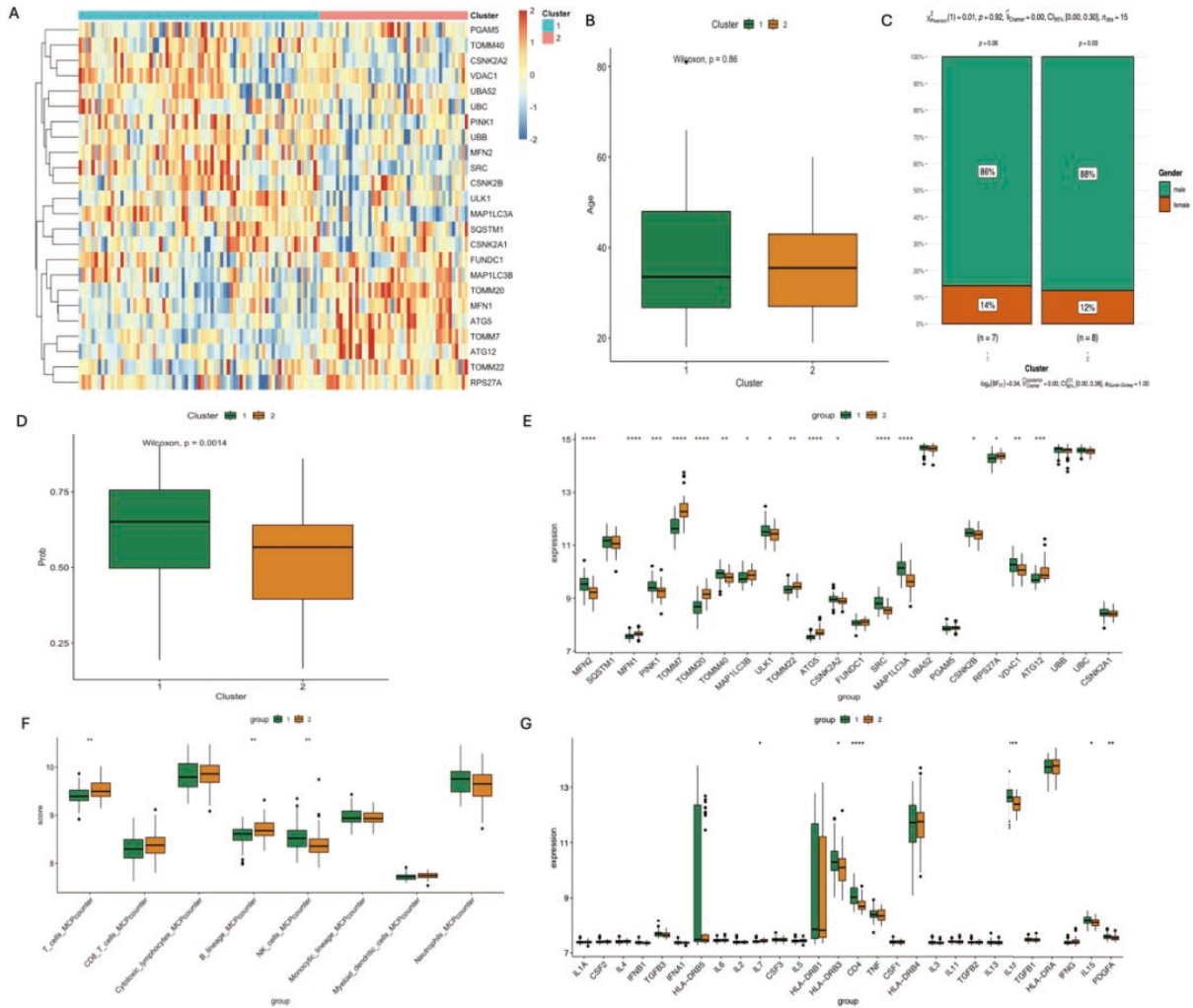
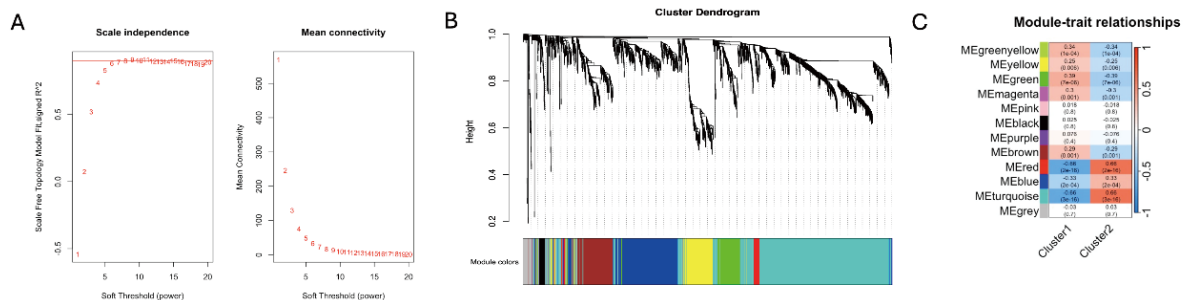


图 6 基于线粒体自噬基因表达和免疫谱的不同亚型 SCZ 患者分析

Fig. 6 Analysis of different subgroups of SCZ patients based on Characteristics of mitophagy gene expression and immunologic profile

A: 两种亚型中 24 个线粒体自噬基因的相关 heatmap; B: 两种亚型的年龄相关性分析; C: 两种亚型的性别相关分析; D: 两种亚型核心基因构建的临床诊断预测模型的相关性分析; E: 两种亚型中 24 个线粒体自噬基因差异表达分析柱状图; F: 两种亚型免疫细胞浸润评分的差异分析; G: 炎症因子在两种亚型中的差异表达分析。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。



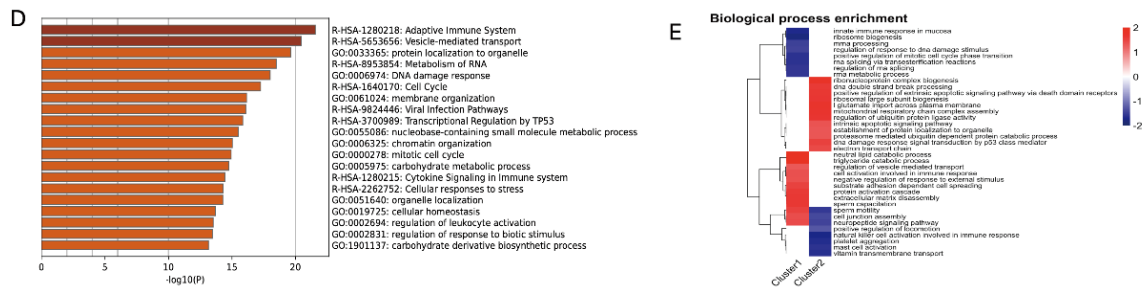


图 7 WGCNA 和 fGSEA 分析结果

Fig. 7 Results of WGCNA and fGSEA analysis

A: 经过一致性评分, 将 SCZ 样本分为两种稳定类型: Cluster1 和 Cluster2; B: WGCNA 分析的尺度独立性(左图)和平均连通性(右图); C: 基因聚类图; D: 12 个模块与两类 SCZ 样本之间的特征关联图; E: red 模块中关键基因的 GO 分析条形图; F: 两类 SCZ 样品生物过程富集分析聚类图。

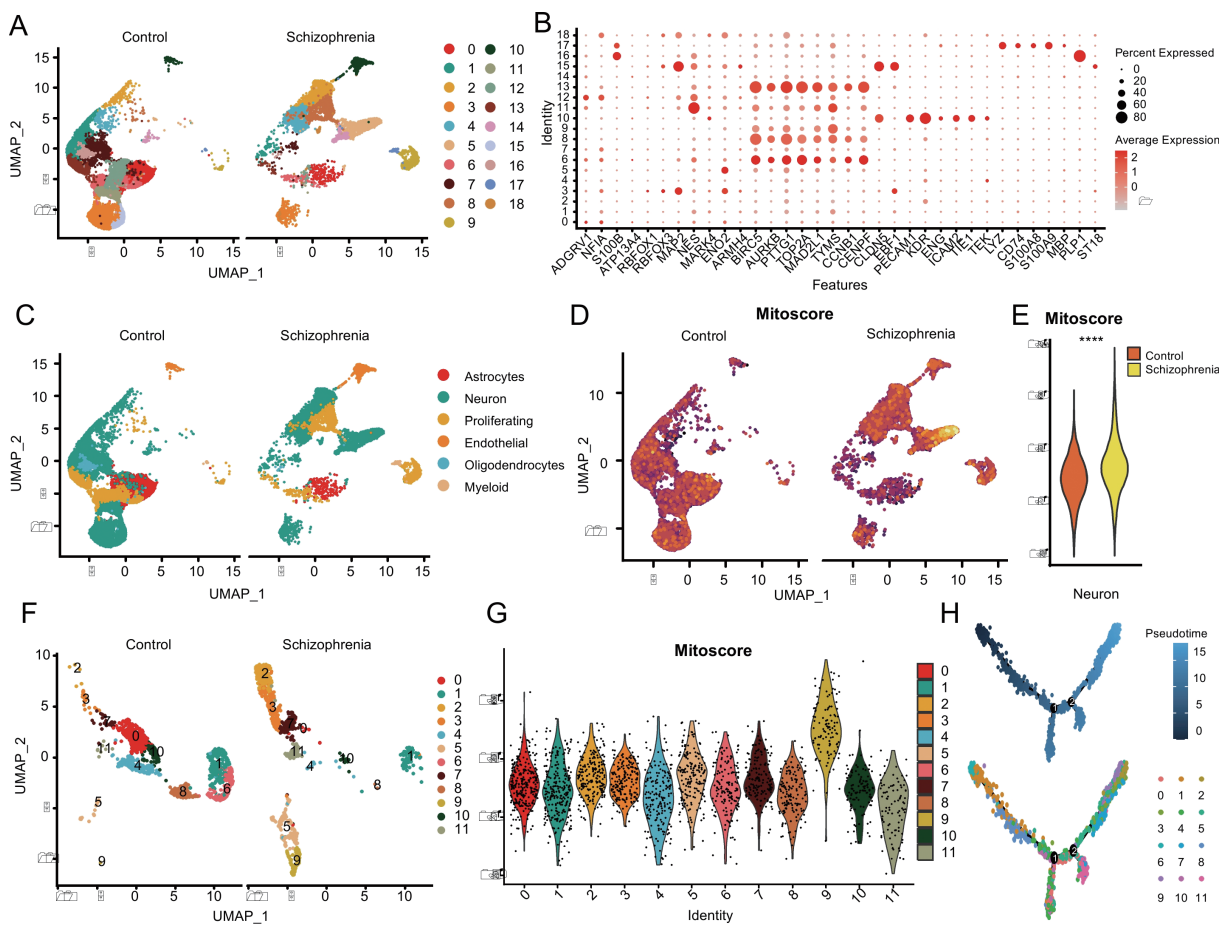


图 8 SCZ 与 CT 供体来源的 3D 脑类器官的单细胞特征比较

Fig. 8 Single-cell profiles of SCZ versus CT donor-derived 3D brain organoids

A: CT 和 SCZ 的单细胞簇结果鉴定出 19 个细胞簇的 UMAP 图; B: 每个亚簇中显著标记基因表达谱的气泡图; C: 单细胞主成分分析主要集中在 6 个成分: 星形胶质细胞、神经元、增殖细胞、内皮细胞、少突胶质细胞和髓系细胞; D: 神经元线粒体自噬评分的两个 UMAP 图; E: SCZ 组和 CT 组神经元亚群线粒体自噬评分差异有统计学意义 ($P < 0.0001$); F: 神经元单细胞降维注释得到的 12 个神经元细胞亚群; G: 12 个神经细胞亚群线粒体自噬谱小提琴图; H: 对线粒体自噬评分的神经元亚群进行逆向时序分析, 线粒体自噬评分高的第 9 组主要位于发育轨迹的末端。

见图 10F。BHLHE40 在 Mitohigh_Neuron 组具有最高的特异性, 而 YY1 在 Mitolow_Neuron 组具有最高的特异性, 见图 10G。DDIT3_extended 和 BHLHE40_extended 在 Mitohigh_Neuron 组显著上

调, 而 XBP1_extended 和 FOS_extended 在 Mitolow_Neuron 组显著上调, 见图 10H。此外, 转录因子 DDIT3、TAF7 和 CEBPB 在 Mitohigh_Neuron 中与 MFN1 和 TOMM20 呈正相关 ($P < 0.001$), 与

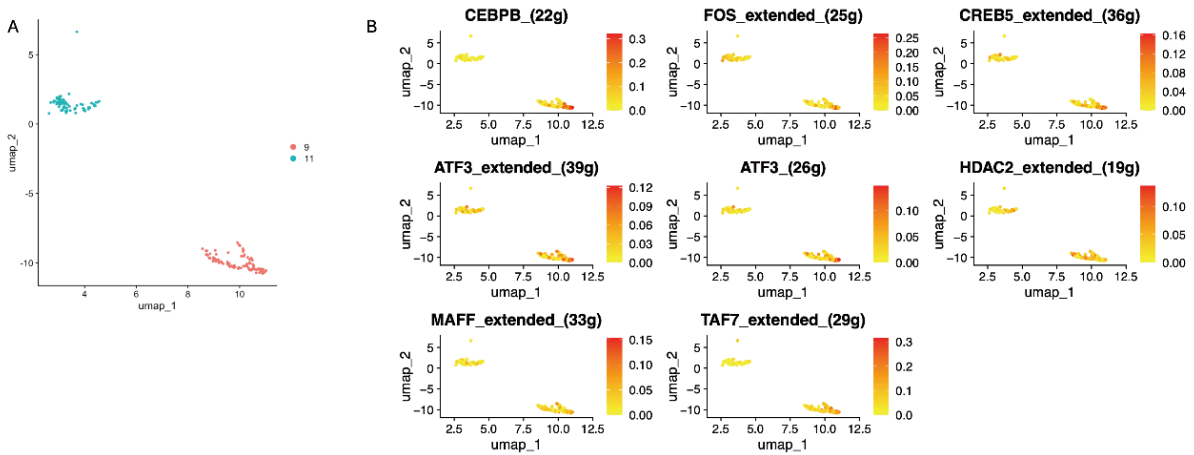


图 9 特异性转录因子亚细胞簇的差异分布

Fig. 9 Differential distribution of subcellular clusters of specific transcription factors

A: 高线粒体自噬评分的第 9 簇和低线粒体自噬评分的第 11 簇; B: 7 个特定转录因子在亚细胞簇 9 和 11 中的分布差异。

CSNK2A2 和 CSNK2B 呈负相关 ($P < 0.001$)。在 Mitolow_Neuron 中, 转录因子 XBP1 与 CSNK2A2 和 PINK1 呈显著正相关 ($P < 0.001$), 而转录因子 YY1 与 ATG12 呈负相关 ($P < 0.001$), 见图 11。

3 讨论

3.1 线粒体自噬基因的重要作用

由于维持正常的电生理活动和突触传递需要较高的能量, 因此, 线粒体在神经元中尤其丰富^[17-18]。线粒体结构和功能异常可能通过影响神经元发挥作用。线粒体自噬在维持线粒体稳态和清除受损线粒体中发挥重要作用^[19]。线粒体自噬过程中的任何失调都可能导致受损线粒体的过度积累, 导致神经元凋亡和脑功能异常, 并可能进展为精神分裂症^[20]。本研究中单细胞分析发现精神分裂症最主要的细胞簇是神经元, 但线粒体自噬基因如何影响神经元及脑功能的作用机制尚不明确, 值得深入分析。

本研究首先发现精神分裂症患者和健康对照之间线粒体自噬基因的表达存在显著差异。其次, 在脑类器官的组织标本的单细胞中同样发现线粒体自噬基因存在差异。通过多种机器学习、聚类分析及单细胞等综合研究方法, 鉴定了 7 个关键的线粒体自噬基因, 从多角度探讨了这些线粒体自噬基因在精神分裂症发生中作用, 具有一定的创新性。

3.2 线粒体自噬基因与免疫细胞和炎症因子的关系

本研究发现线粒体自噬基因的表达与大多数免疫细胞相关, 包括中性粒细胞、活化的 DCs、

活化的 NK 细胞、静息的 NK 细胞、调节性 T 细胞、活化的 CD4 记忆 T 细胞和 CD8 T 细胞。通过一致性聚类分析, 将精神分裂症患者分为两个稳定的亚型, 它们具有不同的线粒体自噬基因表达和免疫学特征。C1 和 C2 亚型在临床表现上没有显著差异, 但在免疫细胞的分布和炎症因子的表达上存在差异。C1 亚型显示出更高的预测准确性, 这表明这一亚组的个体更有可能发展为精神分裂症。不同生物信息学分析结果都说明线粒体自噬基因可能通过调节免疫细胞及炎症因子等神经免疫而发挥作用。

3.3 单细胞分析探索转录因子和信号通路

本研究的单细胞分析结果表明神经元是最主要的细胞簇。与对照组相比, 精神分裂症组的 Mito_Neuron 得分更高 ($P < 0.0001$), 表明神经元异常可能在精神分裂症的发病机制中发挥作用。逆时序分析进一步显示, 较高的 Mitoscores 主要出现在第 9 簇的发育轨迹末端, 表明这些细胞是精神分裂症特有的。另外, 转录因子 CEBPB 和 TAF7 在 Mitohigh_Neuron 中高度表达, 而 FOS 和 CREB5 在 Mitolow_Neuron 中表达水平较高。说明线粒体自噬评分不同的亚型具有不同的特征性转录因子。细胞间相互作用的数量和强度显示 Mitohigh_Neuron-内皮细胞和 Mitolow_Neuron-内皮细胞 SPP1-(ITGA5+ITGB1) 信号通路上的相互作用显示出显著差异。初步表明 SPP1 信号通路可能在 SCZ 的发生机制中具有一定的作用。

3.4 关键线粒体自噬基因可能成为 SCZ 潜在靶点

结合多种机器学习方法, 本研究鉴定出的 7 个关键线粒体自噬基因具有重要的功能。CSNK2A2 和 CSNK2B 是蛋白激酶, 通过非泛素依

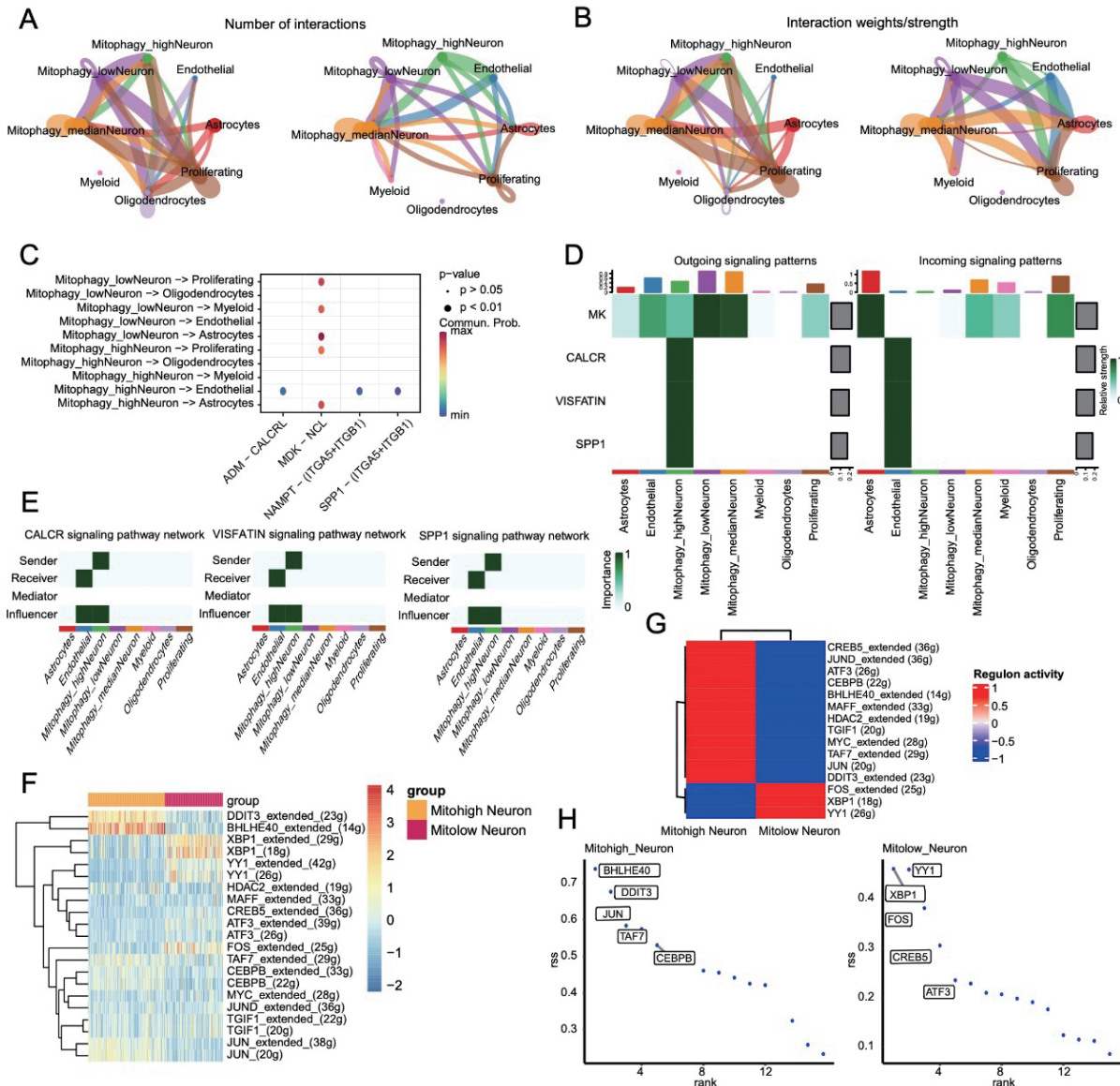


图 10 细胞通讯结果

Fig. 10 Cell communication results

A: 细胞群之间相互作用数量的统计分析。向外的箭头表示表达配体的细胞，指向配体的箭头表示表达受体的细胞；
 B: 交互作用的概率/强度值(强度是概率值的总和)；
 C: 在气泡图中显示多个配体-受体介导的细胞关系之间的相互作用；
 D: 细胞信号传导模式，横轴为细胞类型，纵轴为通路；
 E: 配体-受体信号通路 CALCR、VISFATIN、SPP1 介导的细胞间相互作用热图；
 F: 细胞亚组中显著差异转录因子的曲线下面积(AUC)值热图；
 G: 两个细胞亚群中显著差异转录因子的平均调控活性；
 H: 两个细胞亚群特异性转录因子评分指标散点图。

赖途径调节线粒体自噬，并且参与细胞生长、分化、凋亡等生物学过程的调节^[29]。TOMM40 编码线粒体外膜蛋白 TOM40，TOMM40 的各种单核苷酸多态性与线粒体功能障碍和神经精神疾病相关^[21]。MFN1 位于内外线粒体膜，维持细胞器形态，其下调可以使神经元对凋亡敏感，并损害大脑皮层发育^[22]。MAP1LC3B 是自噬的关键组分，调节线粒体的数量和质量，以满足细胞能量需求并防止过量 ROS 产生^[23]。PGAM5 参与炎症反应、有丝分裂、凋亡、脂质代谢等过程，在神经退行

性疾病和缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[24]。PGAM5 通过去磷酸化 FUNDC1 诱导线粒体自噬，并且也参与 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬^[25]。ATG12 是自噬途径中的关键基因，其编码的 ATG12 蛋白与 ATG5 和 ATG16L1 蛋白形成复合体，调节自噬体早期形成和扩展^[26]。ATG12 的过度表达抑制了体内的神经元轴突发育^[27]。综上所述，CSNK2A2、CSNK2B、TOMM40、MFN1、MAP1LC3B、PGAM5、ATG12 基因与神经发育的发生及进展密切相关，对这 7 个基因继续深入研究有可能为精

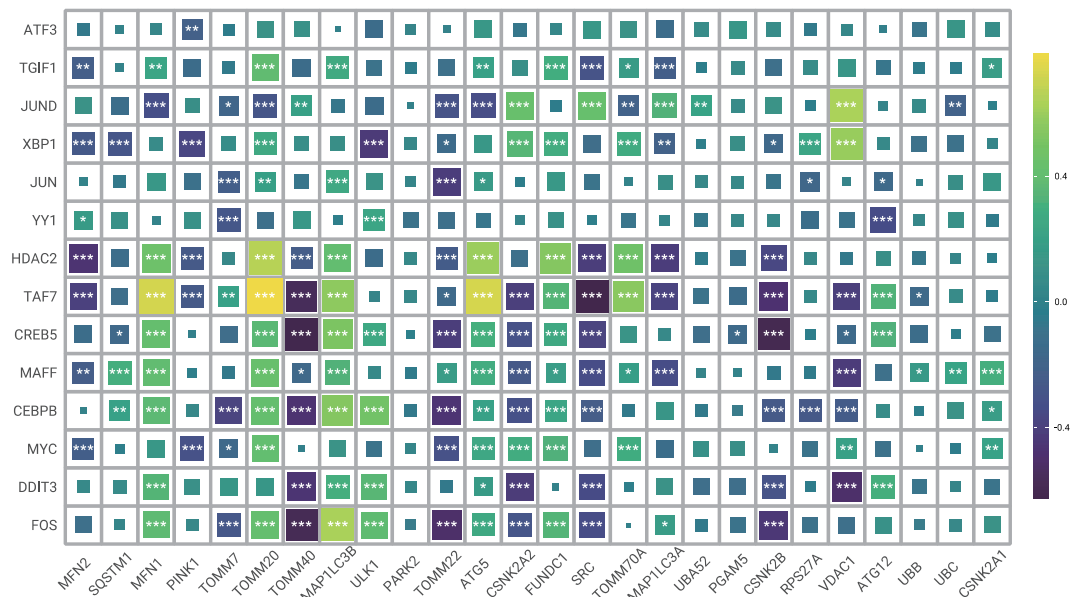


图 11 转录因子与线粒体自噬基因的相关性热图

Fig. 11 Heat map of correlation between transcription factors and mitophagy genes

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

神分裂症的靶向治疗提供新的依据。

3.5 本研究的局限性

本研究存在一定的局限性：首先，使用的单细胞和外周血 RNA 测序数据来自不同的数据集，这些数据集之间的技术差异和生物学异质性可能影响分析结果；其次，精神分裂症患者和对照组的单细胞分析基于 3D 脑类器官，不同样本来源的细胞可能会影响潜在结果。这些细胞可能对精神分裂症中线粒体自噬特征有潜在的影响，未来需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Jauhar S, Johnstone M, McKenna P J. Schizophrenia[J]. Lancet, 2022, 399(10323): 473–486.
- [2] Sullivan P F, Yao S, Hjerling–Leffler J. Schizophrenia genomics: Genetic complexity and functional insights[J]. Nat Rev Neurosci, 2024, 25(9): 611–624.
- [3] Momozawa Y, Mizukami K. Unique roles of rare variants in the genetics of complex diseases in humans[J]. J Hum Genet, 2021, 66(1): 11–23.
- [4] Owen M J, Legge S E, Rees E, et al. Genomic findings in schizophrenia and their implications[J]. Mol Psychiatry, 2023, 28(9): 3638–3647.
- [5] Roberts R C. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: With a focus on postmortem studies[J]. Mitochondrion, 2021, 56(1): 91–101.
- [6] Ni P, Chung S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia[J]. Bioessays, 2020, 42(6): e1900202.
- [7] Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: Mechanisms and potential targets[J]. Sig Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 333.
- [8] Di Rienzo M, Romagnoli A, Refolo G, et al. Role of AMBRA1 in mitophagy regulation: Emerging evidence in aging-related diseases[J]. Autophagy, 2024, 20(12): 1–14.
- [9] Roberts R C. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: With a focus on postmortem studies[J]. Mitochondrion, 2021, 56: 91–101.
- [10] Andreatza A C, Nierenberg A A. Mitochondrial dysfunction: At the core of psychiatric disorders?[J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(9): 718–719.
- [11] Zhu Y, Zhang J, Deng Q, et al. Mitophagy-associated programmed neuronal death and neuroinflammation[J]. Front Immunol, 2024, 15(13): 1460286.
- [12] Shivakumar V, Rajasekaran A, Subbanna M, et al. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in schizophrenia[J]. Asian J Psychiatr, 2020, 53(89): 102193.
- [13] Sebastian R, Song Y, Pak C. Probing the molecular and cellular pathological mechanisms of schizophrenia using human induced pluripotent stem cell models[J]. Schizophr Research, 2024, 22(1): 1–42.

- [14] Newman A M, Liu C L, Green M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453–457.
- [15] Zeng D, Ye Z, Shen R, et al. IOBR: Multi-omics immunology biological research to decode tumor microenvironment and signatures[J]. *Frontiers Immunology*, 2021, 12(10): 687975.
- [16] Simonsen A T, Hansen M C, Kjeldsen E, et al. Systematic evaluation of signal-to-noise ratio in variant detection from single cell genome multiple displacement amplification and exome sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 681.
- [17] Trigo D, Vitória J J, da Cruz E Silva O A B. Novel therapeutic strategies targeting mitochondria as a gateway in neurodegeneration[J]. *Neural Regeneration Research*, 2023, 18(5): 991–995.
- [18] Zhao Y, Shen W, Zhang M, et al. DDAH-1 maintains endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease[J]. *Cell Death Disease*, 2024, 15(6): 399.
- [19] Ma K, Chen G, Li W, et al. Mitophagy, mitochondrial homeostasis, and cell fate[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 24(8): 467.
- [20] Papageorgiou M P, Filiou M D. Mitochondrial dynamics and psychiatric disorders: The missing link[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2024, 165(10): 105837.
- [21] Chen S, Sarasua S M, Davis N J, et al. TOMM40 genetic variants associated with healthy aging and longevity: A systematic review[J]. *BMC Geriatr*, 2022, 22(1): 667.
- [22] Choudhury M, Fu T, Amoah K, et al. Widespread RNA hypoediting in schizophrenia and its relevance to mitochondrial function[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(14): eade9997.
- [23] Bonam S R, Bayry J, Tschan M P, et al. Progress and challenges in the use of MAP1LC3 as a legitimate marker for measuring dynamic autophagy in vivo[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1321.
- [24] Liang M Z, Lu T H, Chen L. Timely expression of PGAM5 and its cleavage control mitochondrial homeostasis during neurite re-growth after traumatic brain injury[J]. *Cell Biosci*, 2023, 13(1): 96.
- [25] Cheng M, Lin N, Dong D, et al. PGAM5: A crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death[J]. *Eur J Cell Biol*, 2021, 100(1): 151144.
- [26] Lystad A H, Carlsson S R, Simonsen A. Toward the function of mammalian ATG12-ATG5-ATG16L1 complex in autophagy and related processes[J]. *Autophagy*, 2019, 5(8): 1485–1486.
- [27] Yang K, Yu B, Cheng C, et al. Mir505-3p regulates axonal development via inhibiting the autophagy pathway by targeting ATG12[J]. *Autophagy*, 2017, 13(10): 1679–1696.